

И. Н. Унков, В. М. Бакулев, Н. А. Касьяненко

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИЭТАНОЛАМИНА С ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДНК И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ПАВ—ДНК*

Санкт-Петербургский государственный университет,
Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Влияние триэтанолamina на состояние высокомолекулярной тимусной ДНК в водно-солевом растворе изучено методами спектрофлуориметрии и вискозиметрии. Показано, что триэтанолamin препятствует взаимодействию флуоресцентного красителя DAPI с фосфатными группами ДНК, но не влияет на связывание красителя с макромолекулой по малой бороздке. Присутствие триэтанолamina в растворе не влияет на вторичную структуру ДНК. Проведена оценка вызванного присутствием аминспирта падения объёма молекулярного клубка ДНК в растворе. При добавлении триэтанолamina в раствор, содержащий сформировавшиеся комплексы ДНК—ПАВ, наблюдается разрушение этих комплексов. Библиогр. 12 назв. Ил. 3.

Ключевые слова: триэтанолamin, растворы ДНК, катионные ПАВ.

Для цитирования: Унков И. Н., Бакулев В. М., Касьяненко Н. А. Взаимодействие триэтанолamina с высокомолекулярной ДНК и его влияние на образование комплексов ПАВ—ДНК // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4 (62). Вып. 1. С. 41–45.

I. N. Unkov, V. M. Bakulev, N. A. Kasyanenko

INTERACTION OF TRIETHANOLAMINE WITH HIGH MOLECULAR DNA AND ITS INFLUENCE ON FORMATION OF SURFACTANT—DNA COMPLEXES

St. Petersburg State University,
7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Effect of triethanolamine (TEA) on high molecular calf thymus DNA in aqueous solution was studied by fluorescent spectroscopy and viscometry. It was shown that TEA prevents the interaction of the fluorescent dye DAPI with phosphate groups, but does not affect binding of the dye to the minor groove of DNA. The presence of TEA in solution does not induce any changes in the secondary structure of DNA. We estimated the decrease of the volume of DNA molecular coil in solution, which is induced by TEA. The destruction of DNA—surfactant complexes formed in solution was observed after the addition of TEA. Refs 12. Figs 3.

Keywords: triethanolamine, DNA, cationic surfactants.

For citation: Unkov I. N., Bakulev V. M., Kasyanenko N. A. Interaction of triethanolamine with high molecular DNA and its influence on formation of surfactant—DNA complexes. *Vestnik SPbSU. Physics and Chemistry*. 2017, vol. 4 (62), issue 1, pp. 34–40.

Введение. Аминспирты, к которым относится используемый в работе триэтанолamin (рис. 1, а), применяются для регулирования pH при изготовлении моющих средств [1], при создании антибактериальных препаратов и средств для наружного применения

* По материалам IV конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвящённой 50-летию специализации «Молекулярная биофизика» на физическом факультете и 105-летию со дня рождения профессора Э. В. Фрисман, 14–15 июня 2016 г., СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, URL: <http://molbioph.niif.spbu.ru/conference>.

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2017

[2], в качестве поглотителей газов [3] и др. Триэтаноламин (далее ТЭА) имеет температуру плавления 20,5°C [4] и является сильным основанием ($pK_a = 7,76$).

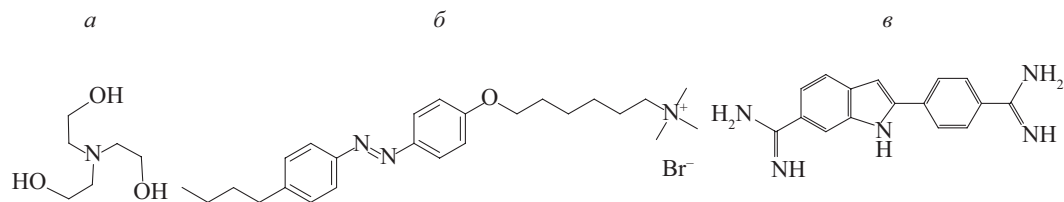


Рис. 1. Структура триэтанолamina (а), поверхностно активного вещества АзоТМАБ (б) и флуоресцентного красителя DAPI (в)

ТЭА не является канцерогеном [5], показывает меньшую токсичность по сравнению с моноэтаноламином и диэтаноламином и не влияет на биологические функции ДНК [6], хотя аминоспирты связываются с синтетическими олигонуклеотидами [7]. ТЭА используют для снижения токсичности катионных ПАВ [8]. Для системы ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) — ТЭА при соотношении компонентов 80 : 20 было получено снижение токсичности на порядок по сравнению с токсичностью ЦТАБ. Катионные ПАВ могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот в клетки [9, 10], поэтому снижение их токсичности является необходимым условием для биологического применения.

Материалы и методы. Использовали ТЭА 99% («Синтез ОКА»), который перед смешиванием с раствором ДНК разбавляли раствором NaCl с добавлением Трис-HCl. Концентрация NaCl во всех исследуемых растворах составляла 5мМ при pH = 7. Препарат ДНК тимуса телёнка («Sigma») с молекулярной массой 10^7 , определённой по значению характеристической вязкости ДНК в 0,15М NaCl, растворяли в деионизованной воде Milli-Q. Перед центрифугированием раствор досаливали до 5мМ NaCl. Светочувствительные катионные азобензолсодержащие поверхностно активные вещества (ПАВ) (рис. 1, б) синтезированы в группе профессора С. Сантер в Потсдамском университете по процедуре, описанной в [11]. Обратимая *транс-цис*-изомерия азогруппы в составе молекул ПАВ при УФ-облучении приводит к изменению гидрофильности этих соединений, что отражается на результате их взаимодействия с молекулой ДНК в растворе [9, 10].

В работе использовали флуоресцирующий краситель DAPI (рис. 1, в), для которого в связанном с ДНК состоянии характерны полосы с максимумом испускания 455 нм (при $\lambda_{\text{возб.}} = 340$ нм) и 540 нм (при $\lambda_{\text{возб.}} = 420$ нм). Первая полоса отражает сильное связывание красителя в малой бороздке ДНК, вторая — существенно более слабое внешнее электростатическое связывание с фосфатными группами ДНК [12]. Сильный тип связывания красителя с ДНК обладает высоким квантовым выходом люминесценции и преобладает при малых отношениях DAPI/ДНК < 0,05 (отношение молярных концентраций красителя и фосфатных групп ДНК далее обозначается r). Слабый тип связывания с низким квантовым выходом флуоресценции хорошо заметен только при $r \approx 0,3$ и при возбуждении на длинноволновом крае спектра поглощения DAPI ($\lambda_{\text{возб.}} = 420$ нм) [12]. В работе применяли спектрофлуориметр Hitachi 850 (Япония). Использованный раствор ТЭА не поглощает в области длин волн более 270 нм.

Результаты и обсуждение. Интенсивность и форма спектров испускания флуоресценции красителя DAPI в растворе ДНК, содержащем ТЭА (DAPI и ТЭА добавляли в раствор ДНК одновременно), практически не изменяются в области значений $r < 0,05$,

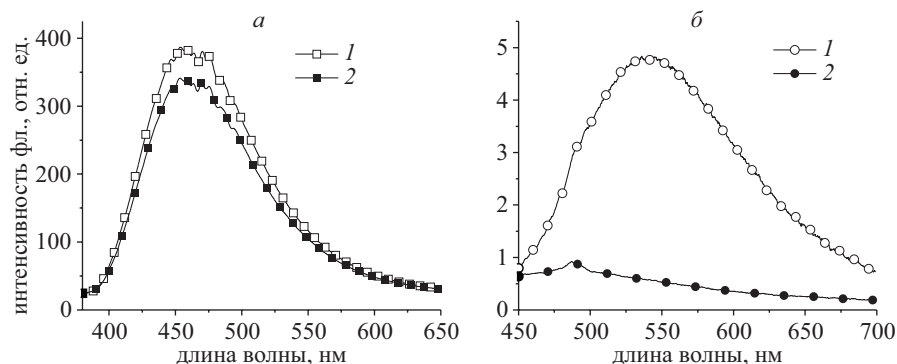


Рис. 2. Спектры испускания (флуоресценции) DAPI в растворе ДНК в 5мМ NaCl без ТЭА (1) и с ТЭА (2) при соотношении DAPI/ДНК $r = 0,03$ (а) и $r = 0,3$ (б): $C(\text{DAPI}) = 5\text{мкМ}$, $C(\text{ТЭА}) = 10 \text{ об. } \%$, $C(\text{ДНК}) = 0,05 \text{ мг/мл}$, $\lambda_{\text{возб.}} = 340 \text{ нм}$ (а) и $C(\text{ДНК}) = 0,005 \text{ мг/мл}$, $\lambda_{\text{возб.}} = 420 \text{ нм}$ (б)

где превалирует сильный тип связывания DAPI по малой бороздке ДНК (рис. 2, а). Это даёт основание полагать, что ТЭА при исследованной концентрации не препятствует образованию соответствующих комплексов DAPI. Добавление ТЭА (рис. 2, б) при $r = 0,3$ почти полностью тушит люминесценцию молекул DAPI, связанных с фосфатными группами ДНК ($\lambda_{\text{возб.}} = 420 \text{ нм}$) и смещает максимум спектра испускания к положению, характерному для не связанных с ДНК молекул красителя. Эти данные указывают на то, что ТЭА блокирует связывание DAPI по фосфатам ДНК.

Для определения относительной вязкости растворов ДНК $\eta_r = \eta/\eta_0$, где η и η_0 — вязкость раствора и растворителя соответственно, использовали низкоградиентный ротационный вискозиметр типа Зимма—Крозерса. Изменение приведённой вязкости раствора при постоянной концентрации ДНК отражает изменение объёма молекулярного клубка. Наблюдавшееся в растворе с $C(\text{ТЭА}) = 5\%$ заметное падение приведённой вязкости (в 1,7 раза по сравнению со значением для раствора, не содержащего ТЭА) позволяет предположить, что это изменение объёма связано не только с нейтрализацией заряда ДНК (о чём свидетельствуют данные по люминесценции DAPI), но и с изменением качества растворителя, окружающего макромолекулу.

Ранее было показано, что используемое ПАВ АзоТМАБ при связывании с фосфатными группами ДНК вызывает образование мицеллярных агрегатов при концентрациях ПАВ ниже критической концентрации мицеллообразования, что сопровождается смещением максимума поглощения полосы ПАВ [9, 10]. При добавлении ТЭА в растворы ДНК с ПАВ в транс-изомерной форме (при постоянной концентрации ДНК и при соотношениях молярных концентраций ПАВ/ДНК в диапазоне $z = 0,1 \div 0,3$) наблюдали смещение максимума полосы поглощения ПАВ в противоположную сторону — к положению, характерному для не связанных с ДНК молекул ПАВ в немицеллярном состоянии (рис. 3, а). В рассматриваемой спектральной области ни ТЭА, ни ДНК не поглощают.

Поскольку данные вискозиметрии и результаты по флуоресценции DAPI в растворах ДНК с ТЭА указывают на электростатическое взаимодействие ТЭА с фосфатными группами ДНК, этот результат позволяет предположить, что аминокспирт разрушает комплекс ДНК—ПАВ.

Заметные изменения в спектре поглощения ПАВ наблюдаются и при использовании его цис-изомеров (рис. 3, б). Кроме сдвигов максимумов для полосы поглощения ПАВ

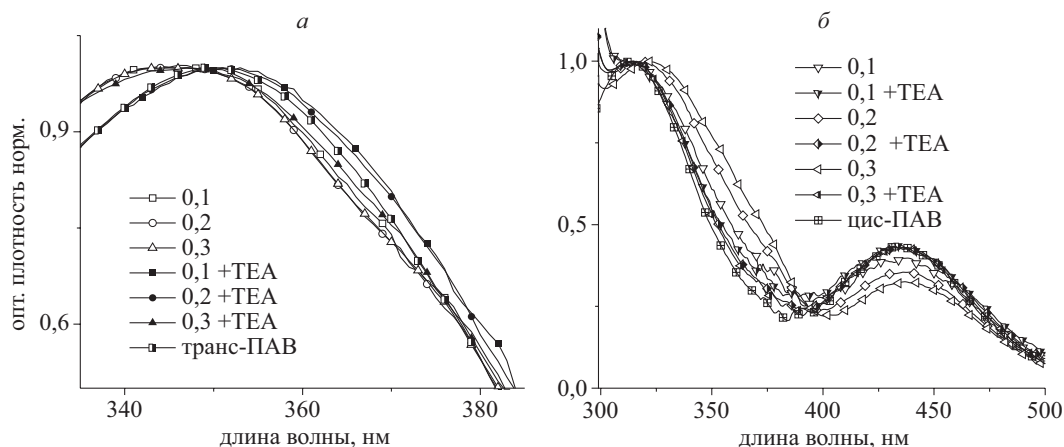


Рис. 3. Нормированные на главный максимум полосы поглощения в рассматриваемой области длин волн спектры поглощения свободного ПАВ, ПАВ в комплексе с ДНК (численные значения $z = 0,1 \div 0,3$) и ПАВ в растворе ДНК с ТЭА («+TEA») в транс- (а) и цис- (б) форме:

$C(\text{ДНК}) = 0,04 \text{ мг/мл}$, $C(\text{ТЭА}) = 10\%$; для свободного ПАВ приведено обозначение «транс-ПАВ» и «цис-ПАВ»

в присутствии ТЭА наблюдалось снижение оптической плотности растворов, содержащих ДНК и ПАВ. Это также указывает на изменение состояния ПАВ в растворах ДНК при добавлении ТЭА.

Выводы. На основании полученных данных можно сделать заключение, что в условиях эксперимента триэтаноламин изменяет состояние фосфатных групп ДНК и вызывает компактизацию её клубка в растворе. ТЭА, нейтрализуя заряд значительной части фосфатных групп макромолекулы, препятствует связыванию использованного катионного ПАВ с ДНК. Присутствие ТЭА в растворе ДНК не влияет на связывание красителя DAPI по малой бороздке макромолекулы (препятствуя его взаимодействию с фосфатными группами ДНК) и не вызывает изменения её вторичной структуры.

Использовалось оборудование ресурсных центров СПбГУ «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» и «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

Литература

1. Final report of a safety assessment for triethanolamine, diethanolamine, monoethanol-amine: expert panel of the cosmetic ingredient review. Washington, 1983. 55 p.
2. Ажгихин И. С. Технология лекарств: 2-е изд. М.: Медицина, 1980. 440 с.
3. Несмеянов А. Н., Несмеянов Н. А. Начала органической химии. Кн. 1. М.: Химия, 1969. 664 с.
4. CRC Handbook of chemistry and physics: 81st ed. / ed. by D. R. Lide. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, 2000. P. 3–159.
5. Knaak J. B., Leung H. W., Stott W. T., Busch J., Bilsky J. Toxicology of mono-, di-, and triethanolamine // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1997. Vol. 149. P. 1–86.
6. Inoue K., Sunakawa T., Okamoto K., Tanaka Y. Mutagenicity tests and *in vitro* transformation assays on triethanolamine // Mutat. Research. 1982. Vol. 10. P. 305–313.
7. Reinemann C., Stoltzburger R., Strehlitz B. Investigations on the specificity of DNA aptamers binding to ethanolamine // Analyt. Chem. 2009. Vol. 81, N 10. P. 3973–3978.

8. Лукашенко С. С., Паширова Т. Н., Волошина А. Д., Жильцова Е. П., Зобов В. В., Захарова Л. Я., Коналов А. И. Полифункциональные нетоксичные составы на основе катионных ПАВ // Тез. докл. III Всерос. симп. с междунар. участием по поверхностно-активным веществам ПАВ-2015. СПб., 2015. С. 91.
9. Kasyanenko N., Lysyakova L., Ramazanov R., Nesterenko A., Yaroshevich I., Titov E., Alexeev G., Lezov A., Unksov I. Conformational and phase transitions in DNA-photosensitive surfactant solutions: experiment and modeling // *Biopolymers*. 2015. Vol. 103. P. 109–122.
10. Zakrevskiy Yu., Kopyshv A., Lomadze N., Morozova E., Lysyakova L., Kasyanenko N., Santer S. DNA compaction by azobenzene-containing surfactant // *Phys. Rev. (E)*. 2011. Vol. 84. 021909.
11. Dumont D., Galstian T., Senkow S., Ritcey A. Liquid crystal photoalignment using new photoisomerisable Langmuir—Blodgett films // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2002. Vol. 375, N 1. P. 341–352.
12. Бакулев В. М., Ревезук З. В., Чжан Цюши, Касьяненко Н. А. Люминесценция комплексов DAPI-ДНК при разных ионных силах раствора // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 4. Физика. Химия. 2014. Т. 1 (59), вып. 4. С. 491–497.

References

1. *Final report of a safety assessment for triethanolamine, diethanolamine, monoethanolamine: expert panel of the cosmetic ingredient review*. Washington, 1983. 55 p.
2. Azhgin I. S. *Tehnologiya lekarstv [Technology of drugs: 2nd ed.]*. Moscow, Meditsina, 1980. 440 p. (In Russian)
3. Nesmeyanov A. N., Nesmeyanov N. A. *Nachala organicheskoi himii. Kniga 1 [Elements of organic chemistry. Book 1]*. Moscow, Khimiia Publ., 1969. 664 p. (In Russian)
4. *CRC Handbook of chemistry and physics: 81st ed.* Ed. by D. R. Lide. Boca Raton, FL, CRC Press LLC, 2000, pp. 3–159.
5. Knaak J. B., Leung H. W., Stott W. T., Busch J., Bilsky J. Toxicology of mono-, di-, and triethanolamine. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 1997, vol. 149, pp. 1–86.
6. Inoue K., Sunakawa T., Okamoto K., Tanaka Y. Mutagenicity tests and *in vitro* transformation assays on triethanolamine. *Mutat. Research.*, 1982, vol. 10, pp. 305–313.
7. Reinemann C., Stoltz R., Strehlitz B. Investigations on the specificity of DNA aptamers binding to ethanolamine. *Analyt. Chem.*, 2009, vol. 81, no 10, pp. 3973–3978.
8. Lukashenko S. S., Pashirova T. N., Voloshina A. D., Zhiltsova E. P., Zobov V. V., Zaharova L. Ya., Konovalov A. I. Polifunkcional'nye netoksichnye sostavy na osnove kationnykh PAV [Polyfunctional nontoxic compositions based on cationic surfactants]. *Tez. dokl. III Vserossiiskogo simp. s mezhdunar. uchastiem po poverkhnostno-aktivnym veshchestvam PAV-2015 [Abstracts of III All-Russian symposium on surfactants PAV-2015]*, Saint Petersburg, 2015, p. 91. (In Russian)
9. Kasyanenko N., Lysyakova L., Ramazanov R., Nesterenko A., Yaroshevich I., Titov E., Alexeev G., Lezov A., Unksov I. Conformational and phase transitions in DNA-photosensitive surfactant solutions: experiment and modeling. *Biopolymers*, 2015, vol. 103, pp. 109–122.
10. Zakrevskiy Yu., Kopyshv A., Lomadze N., Morozova E., Lysyakova L., Kasyanenko N., Santer S. DNA compaction by azobenzene-containing surfactant. *Phys. Rev. (E)*, 2011, vol. 84, 021909.
11. Dumont D., Galstian T., Senkow S., Ritcey A. Liquid crystal photoalignment using new photoisomerisable Langmuir—Blodgett films. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2002, vol. 375, no 1, pp. 341–352.
12. Bakulev V. M., Revuguk Z. V., Qiushi Zhang, Kasyanenko N. A. Liuminestsentsiia kompleksov DAPI-DNK pri raznykh ionnykh silakh rastvora [Luminescence of DAPI-DNA complexes at various ionic strengths]. *Vestnik St. Petersburg University. Series 4. Physics. Chemistry*, 2014, vol. 1 (59), iss. 4, pp. 491–497. (In Russian)

Статья поступила в редакцию 30 июня 2016 г.

Контактная информация

Унксов Иван Никитич — аспирант; e-mail: vanjaunksov@mail.ru

Бакулев Владимир Михайлович — кандидат физико-математических наук;
e-mail: vbakulev@inbox.ru

Касьяненко Нина Анатольевна — доктор физико-математических наук, профессор;
e-mail: nkasyanenko@mail.ru

Unksov Ivan N. — post-graduate student; e-mail: vanjaunksov@mail.ru

Bakulev Vladimir M. — PhD; e-mail: vbakulev@inbox.ru

Kasyanenko Nina A. — Doctor of Physics and Mathematics, Professor; e-mail: nkasyanenko@mail.ru